

---

## 基礎教育講演

---

### 蛋白質リン酸化と脱リン酸化による骨形成と骨吸収

羽地 達次

キーワード：PP1δ, PKR, C23, 骨芽細胞, 破骨細胞

### Protein Kinases and Protein Phosphatases in Bone Formation and Bone Resorption

Tatsuji HANEJI

**Abstract :** Serine and threonine protein phosphatases (PP) are divided into four categories, PP1, PP2A, PP2B, and PP2C. cDNA cloning revealed the existence of at least four isoforms of PP1 catalytic subunit in rat, termed PP1α, PP1γ1, PP1γ2, and PP1δ. Anti-PP1δ antibody recognized a protein present in the nucleolar regions in human and mouse osteoblasts. Cellular fractionation revealed that PP1δ is a 37 kDa protein localized in the nucleolus. C23 (nucleolin) is a nucleolar phosphoprotein and located mainly in the nucleolus. Staining pattern of C23 in human osteoblasts was similar to that of the PP1δ. PP1δ and C23 were specifically stained as dots in the nucleus. The dual fluorescence images revealed that PP1δ and C23 were localized in the same regions in the nucleolus. These results indicate that PP1δ associate with C23 directly in the nucleolus and suggest that C23 is one of the candidates of PP1δ substrates.

Double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) is a serine/threonine protein kinase expressed in mammalian cells. PKR is activated by double-stranded RNA (dsRNA), interferon, cytokines, stress signals, and viral infections. Dominant-negative mutant PKR cDNA, in which the amino acid lysine at 296 was replaced with arginine and which does not have catalytic activity, was constructed. The mutant cDNA was transfected into mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells and preosteoclastic mouse macrophage RAW264.7 cells. Using these cells, our group demonstrated that PKR plays important roles in the differentiation and calcification of osteoblasts by modulating STAT1α and/or Runx2 expression. In this review, I also described that PKR is required for the osteoclast formation of preosteoclastic cell by fusing these cells to form multi-nucleated giant cells.

#### I. はじめに

細胞増殖, 細胞分化, 細胞周期, 細胞の癌化およびアポトーシスの制御に蛋白質のリン酸化に加え, 脱リン酸化が重要な役割を果たすことが明らかになってきた<sup>1-5)</sup>。蛋白質脱リン酸化酵素は, セリン・スレオニン特異的蛋白質脱リン酸化酵素とチロシン特異的蛋白質脱リン酸化酵素, およびその両者を特異的に脱リン酸化する酵素の3種類に大別される。セリン・スレオニン特異的蛋白質

脱リン酸化酵素は, 酵素学的な性質の相違, 基質特異性, 阻害剤に対する感受性, 活性時の金属イオン要求性などの差異により大きく1型 (PP1), 2A型 (PP2A), 2B型 (PP2B), 2C型 (PP2C) に分類される<sup>1-5)</sup>。PP1は調節サブユニットと触媒サブユニットから構成されるホロ酵素であり, ラットの触媒サブユニットのアイソフォームはα, δ, γ1, γ2の4種類が最もよく知られている<sup>6)</sup>。各アイソフォーム間のアミノ酸配列の差異はN末端の40

残基とC末端の30残基に集中しており、それ以外の部分では高いホモロジーが維持されている。この高い類似性のため各アイソフォームの臓器分布、細胞内局在、機能分担などについては未だ不明な点が多い。

Nucleolar Organizer Regions (NORs) は細胞の核小体に局在し、病理組織学的には硝酸銀により黒褐色に染色される AgNORs の一部であり<sup>7)</sup>、構成蛋白質の主なものに C23 (ニュークレオリン) と B23 (ニュークレオフォスミン) が知られている<sup>8-11)</sup>。C23 はリン酸化蛋白質で、核・細胞質間を移行し、リボゾーム RNA 合成に関係する<sup>8-10)</sup>。B23 もリン酸化蛋白質であり、細胞内でシャペロンとして機能し<sup>11)</sup>、核小体に局在するとともに複製前の中心体に存在し、CDK2/サイクリン E によりリン酸化を受けた後、中心体から解離する<sup>8)</sup>。C23 と B23 の機能や細胞内局在にはそれぞれのリン酸化状態が関係しており、セリン・スレオニン特異的蛋白質リン酸化酵素がそのリン酸化を触媒する<sup>10, 11)</sup>。オカダ酸とカリクリン A は真核細胞においてセリンとスレオニン残基に結合したリン酸を脱リン酸化する蛋白質脱リン酸化酵素 1 型および 2 A 型の阻害剤である<sup>12, 13)</sup>。PP1 $\delta$  が C23 と結合して C23 の脱リン酸化を触媒する可能性が考えられるが、PP1 $\delta$  と C23 および PP1 $\delta$  と B23 との相互作用についてはいまだ検討されていない。

## II. 蛋白質脱リン酸化酵素の細胞内局在

蛋白質脱リン酸化酵素は蛋白質リン酸化酵素と同様に細胞の各状態に応じて特異的な細胞内局在を示し、その局在が細胞の機能と密接に関係する<sup>14)</sup>。つまり、蛋白質脱リン酸化酵素は細胞内でその基質に結合するかその近傍に局在することにより機能する。マウス (MC3T3-E1 細胞) およびヒト (MG63 細胞, Saos-2 細胞) 骨芽細胞における PP1 の局在は非常に特異的で<sup>15-19)</sup>、PP1 $\alpha$  は細胞核に瀰漫性に分布し、PP1 $\gamma$ 1 は核周辺に局在する。PP1 $\delta$  は細胞核に 5-7 個のドット様構造として、核小体に強力に発現している。PP1 $\delta$  の存在様式はリボゾーム RNA 合成の場と考えられ、硝酸銀により染色される Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) の細胞内局在と酷似する<sup>7, 8)</sup>。図 1 に Saos-2 細胞における PP1 各アイソフォームの局在を示す。PP1 $\gamma$ 2 は精子形成細胞に特異的に存在するアイソフォームであり、骨芽細胞には発現しない<sup>15)</sup>。我々は、マウス骨芽細胞 (MC3T3-E1) で細胞分画を行い、細胞質画分、核画分および核小体画分から電気泳動用試料を調製して、ウエスタンブロット法にて、抗-PP1 $\delta$  抗体と反応する蛋白質を同定した<sup>16)</sup>。抗-PP1 $\delta$  抗体は核画分および核小体画分に存在する 37 kDa の蛋白質と強く反応した (図 2)。同様な所見はヒト骨芽細胞でも認められる<sup>16-19)</sup>。

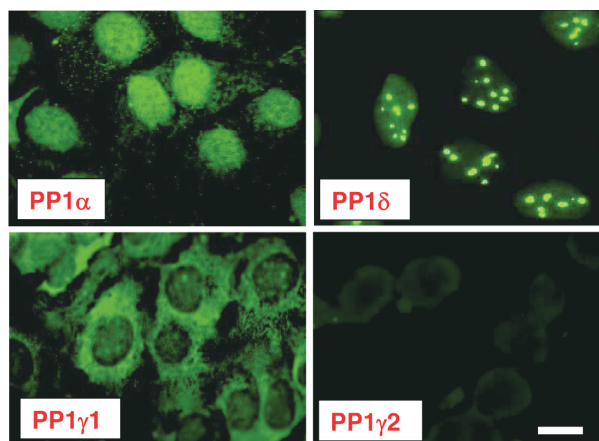


図 1 ヒト骨芽細胞 (Saos-2 細胞) における PP1 各アイソフォームの細胞内局在  
コンフルエント状態の Saos-2 細胞をホルマリンで固定後、抗-PP1 $\alpha$  抗体、抗-PP1 $\delta$  抗体、抗-PP1 $\gamma$ 1 抗体および抗-PP1 $\gamma$ 2 抗体を用いて免疫反応を行い、蛍光顕微鏡で細胞の形態を観察した。PP1 $\alpha$  は核に、PP1 $\delta$  は核小体に、PP1 $\gamma$ 1 は核周辺の細胞質に局在した。PP1 $\gamma$ 2 では陽性反応は認められなかった。白バーは 10  $\mu$ m を示す。

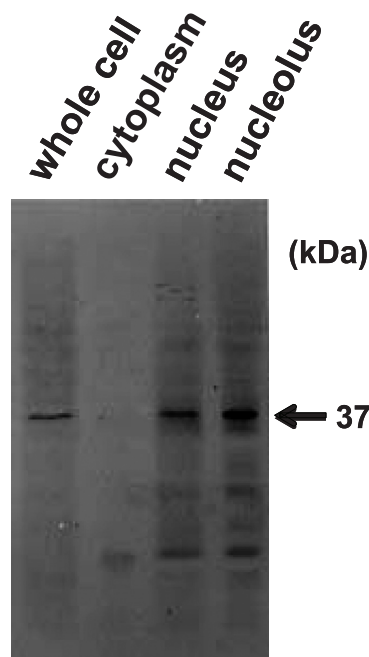


図 2 マウス骨芽細胞 (MC3T3-E1 細胞) における PP1 $\delta$  の細胞内局在  
コンフルエント状態の MC3T3-E1 細胞で細胞分画を行い、細胞質 (cytoplasm)、核 (nucleus)、核小体 (nucleolus) 画分を得た。それぞれの画分から電気泳動用試料を作製して抗-PP1 $\delta$  抗体を用いてウエスタンブロットを行った。PP1 $\delta$  は核小体に存在する 37 kDa の蛋白質を強力に反応した。MC3T3-E1 細胞から調製した試料 (whole cell) を対照として用いた。

### Ⅲ. PP1δ と C23 および B23 の細胞内局在と相互作用

PP1δ が核小体に局在し、その存在様式が AgNORs と酷似することから、我々は、PP1δ は核小体内に存在する NORs の構成蛋白質 C23 や B23 と結合し、それぞれを基質として脱リン酸化するという仮説を立てた。抗-PP1δ ポリクローナル抗体と抗-C23 モノクローナル抗体、二次抗体としてローダミン標識抗ウサギ IgG と FITC 標識抗マウス IgG を用い MG63 細胞内での両者の局在を蛍光抗体法で調べた<sup>17)</sup>。PP1δ は細胞核に 5-7 個のドット状構造物として核小体に存在し、その反応はローダミンの赤色として検出された。C23 は FITC の緑色として PP1δ と同じ反応部位で染色された。両者の反応を重ね合わせると、PP1δ と C23 の細胞内局在は完全に一致し、黄色の反応として検出された（図 3）。この所見は細胞核内で PP1δ と C23 が結合して存在している事を示す。次に PP1δ と C23 との間に直接的な結合が存在するかを、抗-PP1δ 抗体を用いた免疫沈降法で調べた。抗-PP1δ 抗体を用いて MG63 細胞の細胞抽出液を免疫沈降すると抗-C23 抗体と反応する 110 kDa の反応陽性バンドが検出された<sup>17)</sup>。正常ウサギ血清を用いて細胞抽出液を免疫沈降しても抗-C23 抗体と反応するバンドは検出されなかった。よって PP1δ と C23 は MG63 細胞の核小体内で互いに結合して存在していると結論した。我々は最近、PP1δ と B23 が細胞内で結合して存在することも報告した<sup>19)</sup>。以上の結果から PP1δ は細胞の核内で C23 と B23 と結合し、それぞれを基質として脱リン酸化すると考えられる。

### Ⅳ. 骨芽細胞の分化と蛋白質リン酸化酵素（PKR）

正常な骨組織においては骨形成と骨吸収のバランスが一定に保たれており、関節リウマチや歯周症を含む骨性疾患はこのバランスの破綻が原因である<sup>20, 21)</sup>。骨形成過程で、分化した骨芽細胞は骨基質を産生し、あるものはその基質によって囲まれて骨内に留まり骨細胞となる。他の骨芽細胞は新たに形成された骨の表面にそのまま留まり、いわゆるライニング骨芽細胞となり、次の骨基質を形成する。骨形成過程で 50-70% の骨芽細胞はアポトーシスによって死滅する<sup>22)</sup>。骨芽細胞の機能に関する研究は様々なアプローチから行われてきたが、骨芽細胞の分化、破骨細胞の形成と蛋白質リン酸化・脱リン酸化に関する研究は少ない。我々は蛋白質脱リン酸化と骨芽細胞の分化に注目し、蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤かつ発癌のプロモーターであるオカダ酸とカリクリン A を用いて一連の研究を進めてきた。我々はまず、インビトロで骨芽細胞様の性質を有するマウス MC3T3-E1 細胞を用いて研究を開始した。オカダ酸とカリクリン A は濃度および時間に依存して MC3T3-E1 細胞の分化を促進した。分化した細胞ではアルカリ性フォスホターゼ活性の上昇、骨形成関連蛋白質の発現等分化した骨芽細胞

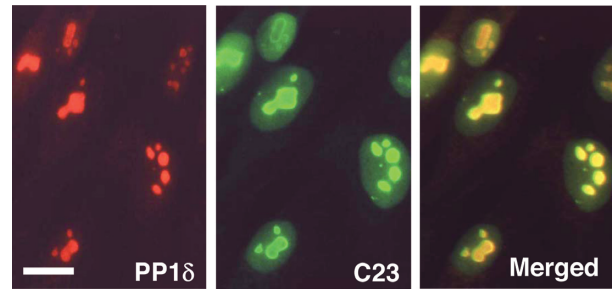


図 3 ヒト骨芽細胞（MG63 細胞）における PP1δ と C23 の局在

MG63 細胞を固定後、PP1δ と C23 の局在を免疫 2 重染色法により解析した。PP1δ に対する 2 次抗体としてローダミンを、C23 に対する 2 次抗体として FITC を用いた。PP1δ は赤色に、C23 は緑色に染色された。この両者を重ね合わせると、黄色の蛍光として観察された（Merged）。バーは 10  $\mu$ m を示す。

の性質を有していた<sup>23, 24)</sup>。それぞれの至適濃度は 20 nM と 2 nM であり、これらの濃度はインビトロで細胞内の PP1 と PP2A を阻害する濃度である。よって、細胞内の蛋白質脱リン酸化酵素活性を阻害することにより、オカダ酸とカリクリン A は骨芽細胞の分化を誘導すると考えられる<sup>25)</sup>。我々はその過程で、オカダ酸とカリクリン A により誘導される骨芽細胞の分化は double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) の活性と NF- $\kappa$ B のリン酸化を介していることを明らかにした<sup>26-30)</sup>。

PKR はインターフェロンや 2 本鎖 RNA 等により活性化され、細胞の防御機構に関与する蛋白質リン酸化酵素である。PKR は自己リン酸化により活性化し、転写調節因子 eIF-2 $\alpha$  をリン酸化してシグナルを伝達する<sup>31-33)</sup>。我々は、PKR の触媒部位の 296 番目に位置するリジンをアルギニンに変異した cDNA を作製、ヒトおよびマウス骨芽細胞（MG63 細胞、MC3T3-E1 細胞）に導入し、PKR 不活性型骨芽細胞株を樹立した<sup>27, 28, 34, 35)</sup>。変異型マウス骨芽細胞（K/R）では PKR 自己リン酸化能の欠如、ALP 活性の低下、骨関連蛋白質発現の減少および *in vitro* における石灰化能の欠如等骨芽細胞としての特性を失っていた（図 4）。また、K/R 細胞では骨形成のマスター遺伝子である Osterix の発現が低下し、STAT1 の発現が増加していた。よって我々は、PKR は Osterix と STAT1 の活性を介して骨形成を促進すると考えた。

### Ⅴ. 破骨細胞の形成と蛋白質リン酸化酵素（PKR）

インターフェロン刺激下でウイルス 2 本鎖 RNA が感染すると PKR は自己リン酸化により活性化し、eIF-2 $\alpha$  をリン酸化して蛋白質合成を抑制する。また、近年 PKR の発現と活性は TNF $\alpha$  や LPS などの刺激によって増強され、NF- $\kappa$ B や STAT シグナルを制御すること



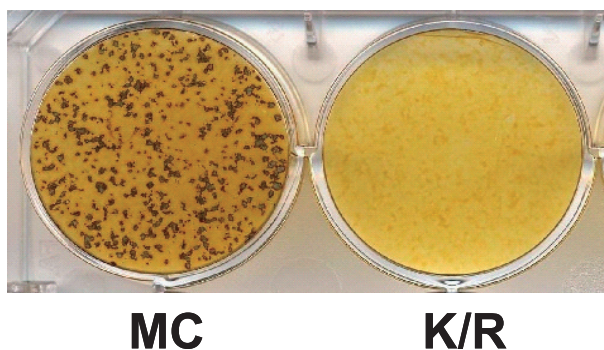
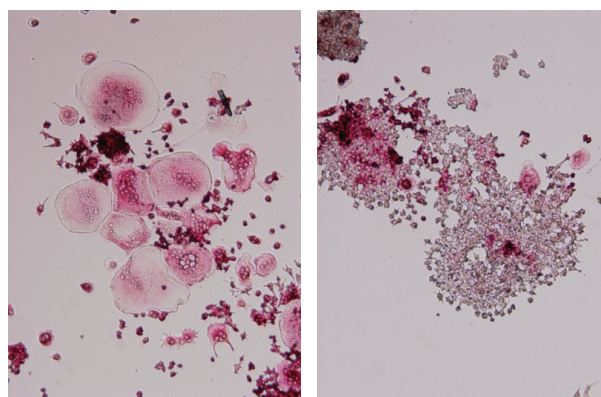


図4 PKR 不活性マウス MC3T3-E1 細胞の *in vitro* 石灰化  
野生型マウス MC3T3-E1 細胞 (MC) と PKR 不活性 MC3T3-E1 細胞 (K/R) を 25 日間培養し、von Kossa 染色にて石灰化を調べた。K/R 細胞では石灰化を示す沈着物は見られなかった。

が明らかになった。骨代謝において骨吸収を担う破骨細胞も、細胞外のインターフェロン、TNF $\alpha$ 、LPS 等や細胞内の NF- $\kappa$ B、STAT シグナルにより分化制御を受けること、破骨細胞形成細胞であるマクロファージの活性に PKR が関与すること<sup>36, 37)</sup> から、我々は破骨細胞の形成と機能にも PKR が関与している可能性があると考えた。

RAW264.7 細胞はマクロファージ系の細胞で RANKL の刺激により、破骨細胞に分化する破骨前駆細胞として知られている<sup>38)</sup>。我々は PKR 阻害剤 2-アミノプリン (2-AP) で RAW 細胞を前処理することにより破骨細胞の分化を調べた。RAW264.7 細胞は RANKL 刺激により、多核で TRAP 陽性の巨大細胞、つまり破骨細胞に分化する<sup>38)</sup>。破骨細胞の形成は RANKL の濃度に依存して増加した。ところが、RANKL 投与前に 2-AP で RAW264.7 細胞を処理すると、細胞は単核のままで破骨細胞の形成は抑制された (図 5)。

破骨細胞の形成と PKR の関係をより詳細に調べるために、我々は骨芽細胞と同様に PKR の触媒部位の 296 番目のリジンをアルギニンに変換した遺伝子を RAW264.7 細胞に導入し、PKR の酵素活性を持たない細胞株をクローニングして、ドミナント・ネガティブの細胞株 (K/R) を作成した。コントロールとして、pcDNA のみを導入した RAW264.7 細胞を用いた<sup>39)</sup>。RANKL で RAW264.7 細胞と pcDNA 導入 RAW264.7 細胞を刺激すると、多核で TRAP 陽性の巨大細胞つまり破骨細胞が RANKL の処理濃度に依存して出現した<sup>39)</sup>。ところが K/R 細胞では巨大細胞の出現は認められなかった。RANKL 刺激後 16 時間後に、リアルタイム PCR で Macrophage fusion receptor (MFR) と DC-STAMP の発現を調べると、K/R 細胞では両者の発現とも抑制されていた<sup>39)</sup>。このことは、K/R 細胞では細胞融合が起こらないために、破骨細胞形成が抑えられていると考えられる<sup>40, 41)</sup>。同様に 2-AP 処理 RAW264.7 細胞と K/R 細胞では成熟破骨細胞分化マ



## 2-AP (-) 2-AP (+)

図5 PKR 阻害剤 (2-アミノプリン) による破骨細胞形成の阻害

RAW264.7 細胞を RANKL で 4 日間処理すると TRAP 陽性多核巨大細胞 (破骨細胞) が形成された [2-AP(-)]。ところが、RAW264.7 細胞を 2-アミノプリンで前処理し、その後 RANKL で破骨細胞形成を誘導しても TRAP 陽性多核巨大細胞は出現しなかった [2-AP(+)]。

カーであるカテプシン K とカルシトニンレセプターの発現も抑制されていた<sup>39)</sup>。

破骨細胞の分化系で NF- $\kappa$ B カスケードが重要であることはよく知られている<sup>42-44)</sup>。RANKL 刺激により、RAW264.7 細胞における NF- $\kappa$ B の発現は促進されたが、2-AP 前処理によりその発現は抑制された。同様に K/R 細胞においても NF- $\kappa$ B の発現は抑制された。また、RANKL は RAW264.7 細胞の STAT1 の発現を促進したが、RANKL 刺激によっても STAT3 の発現は促進されなかった。新生児マウスの指節骨において、PKR は TRAP 陽性多核巨大細胞、つまり破骨細胞に強く発現されていた<sup>39)</sup>。以上の結果から PKR は骨芽細胞の分化に必須であるのみでなく、破骨細胞の形成にも必須であることが判明した。なお、我々のグループはさらに PKR が軟骨の形成にも重要である所見を得ている。

## VI. おわりに

本稿は平成 22 年 7 月 1 日に行われた第 29 回四国歯学会総会で基礎系教育講演として発表した内容をもとにしている。まず、蛋白質脱リン酸化酵素 (PP1 $\delta$ ) の細胞内局在について簡単に論じ、蛋白質脱リン酸化酵素 (PKR) と骨芽細胞分化と破骨細胞の形成について現在我々の研究室で行われている研究成果を中心に概略した。本稿で紹介した研究成果は村田貴俊、森本景之、吉田賀弥、岡村裕彦、寺町順平、佐々木英子との共同研究によって得られたものである。この場を借りて紹介したい。

# 引用文献

- 1) Hunter T: Protein kinase and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80, 225-236 (1995)
- 2) Mansuy IM and Shenolikar S: Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory. *Trend Neurosci* 29, 679-686 (2006)
- 3) Shi Y: Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 139, 468-484 (2009)
- 4) Virshup DM and Shenolikar S: From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* 33, 537-545 (2009)
- 5) Bollen M, Peti W, Ragusa MJ and Beullens M: The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends Biochem Sci* 35, 450-458 (2010)
- 6) Sasaki K, Shima H, Kitagawa Y, Irino S, Sugimura T and Nagao M: Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 81, 1272-1280 (1990)
- 7) Derenzini M: The AgNORs. *Micron* 31, 117-120 (2000)
- 8) Sirri V, Roussel P, Gendron MC and Hernandez-Verdun D: Amounts of the two major Ag-NOR proteins, nucleolin, and protein B23 is cell-cycle dependent. *Cytometry* 28 147-156 (1997)
- 9) Srivastava M and Pollard HB: Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J* 13, 1911-1922 (1999)
- 10) Ginisty H, Sicard H, Roger B and Bouvet P: Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* 112, 761-72 (1999)
- 11) Szebeni A and Olson MO: Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci* 8, 905-912 (1999)
- 12) Cohen P, Holmes CFB and Tsukitani Y: Okadaic acid: A new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci* 15, 98-102 (1990)
- 13) Suganuma M, Fujiki H, Furuya-Suguri H, Yoshizawa S, Yasumoto S, Kato Y, Fusetani N and Sugimura T: Calyculin A, an inhibitor of protein phosphatases, a potent tumor promoter on CD-1 mouse skin. *Cancer Res* 50, 3521-3525 (1990)
- 14) Inagaki N, Ito M, Nakano T and Inagaki M: Spatiotemporal distribution of protein kinase and phosphatase activities. *Trends Biochem Sci* 19, 448-452 (1994)
- 15) Shima H, Haneji T, Hatano Y, Sasaki K, Sugimura T and Nagao M: Protein phosphatase 1 $\gamma$ 2 is associated with nuclei of meiotic cells in rat testis. *Biochem Biophys Res Commun* 194, 930-937 (1993)
- 16) Haneji T, Morimoto H, Morimoto Y, Shirakawa S, Kobayashi S, Kaneda C, Shima H and Nagao M: Subcellular localization of protein phosphatase type 1 isotypes in mouse osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 248, 39-43 (1998)
- 17) Morimoto H, Okamura H and Haneji T: Interaction of protein phosphatase 1 $\delta$  with nucleolin in osteoblastic cells. *J Histochem Cytochem* 50, 1187-1193 (2002)
- 18) Haneji T: Association of protein phosphatase 1  $\delta$  with nucleolin in osteoblastic cells and cleavage of nucleolin in apoptosis-induced osteoblastic cells. *Acta Histochem Cytochem* 38, 1-8 (2005)
- 19) Haneji T, Teramachi J, Hirashima K, Kimura K and Morimoto H: Interaction of protein phosphatase 1 $\delta$  with nucleophosmin in human osteoblastic cells. *Acta Histochem Cytochem* (in press)
- 20) Roodman GD: Regulation of osteoclast differentiation. *Ann NY Acad Sci* 1068, 100-109 (2006)
- 21) Teitelbaum SL: Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol* 170, 427-435 (2007)
- 22) Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM and Manolagas SC: Osteoblast programmed cell death (apoptosis): Modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 13, 793-802 (1998)
- 23) Murata T, Shirakawa S, Takehara T, Kobayashi S and Haneji T: Protein phosphatase inhibitors, okadaic acid and calyculin A, induce alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells derived from newborn mouse calvaria. *Biochem Mol Biol Intern* 36, 365-372 (1995)
- 24) Okamura H, Yoshida K, Ochiai K and Haneji T: Reduction of protein phosphatase 2A C $\alpha$  enhances bone formation and osteoblast differentiation through the expression of bone-specific transcription factor Osterix. *Bone* 49, 368-375 (2011)
- 25) Morimoto Y, Ohba T, Kobayashi S and Haneji T: The protein phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A induce apoptosis in human osteoblastic cells. *Exp Cell Res* 230, 181-186 (1997)
- 26) Morimoto H, Morimoto Y, Kobayashi S, Kido H, Ohba T and Haneji T: Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis protect against okadaic acid-induced apoptosis in human osteosarcoma cell line MG63 cells but not in Saos-2 cells. *J Bone Miner Metab* 17, 266-273 (1999)
- 27) Morimoto H, Okamura H, Yoshida K, Kitamura S and Haneji T: Okadaic acid induces apoptosis through double-stranded RNA-dependent protein kinase/eukaryotic initiation factor-2 $\alpha$  pathway in human osteoblastic MG63 cells. *J Biochem* 136, 433-438 (2004)
- 28) Morimoto H, Ozaki A, Okamura H, Yoshida K, Kitamura S and Haneji T: Okadaic acid induces tyrosine

- phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  that mediated by PKR pathway in human osteoblastic MG63 cells. *Mol Cell Biochem* 276, 211-217 (2005)
- 29) Ozaki A, Morimoto H, Tanaka H, Okamura H, Yoshida K, Amorim BR and Haneji T: Okadaic acid induces phosphorylation of p65NF- $\kappa$ B on serine 536 and activates NF- $\kappa$ B transcriptional activity in human osteoblastic MG63 cells. *J Cell Biochem* 99, 1275-1284 (2006)
  - 30) Tanaka H, Yoshida K, Okamura H, Morimoto H, Nagata T and Haneji T: Calyculin A induces apoptosis and stimulates phosphorylation of p65NF- $\kappa$ B in human osteoblastic osteosarcoma MG63 cells. *Int J Oncol* 31, 389-396 (2007)
  - 31) Kumar A, Haque J, Lacoste J, Hiscott J and Williams BRG: Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF- $\kappa$ B by phosphorylating I $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 6288-6292 (1994)
  - 32) Garcia MA, Meurs EF and Esteban M: The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control. *Biochimie* 89, 799-811 (2007)
  - 33) Sadler AJ and Williams BRG: Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8, 559-568 (2008)
  - 34) Yoshida K, Okamura H, Amorim BR, Ozaki A, Tanaka H, Morimoto H and Haneji T: Double-stranded RNA-dependent protein kinase is required for bone calcification in MC3T3-E1 cells in vitro. *Exp Cell Res* 311, 117-125 (2005)
  - 35) Yoshida K, Okamura H, Amorim BR, Hinode D, Yoshida H and Haneji T: PKR-mediated degradation of STAT1 regulates osteoblast differentiation. *Exp Cell Res* 315, 2105-2114 (2009)
  - 36) Maggi Jr LB, Heitmeier MR, Scheuner D, Kaufman RJ, Buller RML and Corbett JA: Potential role of PKR in double-stranded RNA-induced macrophage activation. *EMBO J* 19, 3630-3638 (2000)
  - 37) Pereira RM, Teixeira KLD, Barreto-de-Souza V, Calegari-Silva TC, De-Melo LDB, Soares DC, Bou-Habib DC, Silva AM, Saraiva EM and Lopes UG: Novel role for the double-stranded RNA-activated protein kinase PKR: modulation of macrophage infection by the protozoan parasite *Leishmania*. *FASEB J* 24, 617-626 (2010)
  - 38) Tanaka S, Nakamura K, Takahashi N and Suda T: Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL-RANK signaling system. *Immunol Rev* 208, 30-49 (2005)
  - 39) Teramachi J, Morimoto H, Baba R, Doi Y, Hirashima K and Haneji T: Double stranded RNA-dependent protein kinase is involved in osteoclast differentiation of RAW264.7 cells in vitro. *Exp Cell Res* 316, 3254-3262 (2010)
  - 40) Vignery A: Macrophage fusion: the making of osteoclasts and giant cells. *J Exp Med* 202, 337-340 (2005)
  - 41) Kukita T, Wada N, Kukita A, Kakimoto T, Sandra F, Toh K, Nagata K, Iijima T, Horiuchi M, Matsusaki H, Hieshima K, Yoshie O and Nomiyama H: RANKL-induced DC-STAMP is essential for osteoclastogenesis. *J Exp Med* 200, 941-946 (2004)
  - 42) Wada T, Nakashima T, Nishina H and Penninger JM: RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 12, 17-25 (2006)
  - 43) Jimi E and Ghosh S: Role of nuclear factor- $\kappa$ B in the immune system and bone. *Immunol Rev* 208, 80-87 (2005)
  - 44) Soysa NS and Alles N: NF- $\kappa$ B function in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 378, 1-5 (2009)